



27123

PATENT TRADEMARK OFFICE

# 说明书 (Specification)

## 转基因盐藻生物反应器及其制备方法和用途 (Transgenic Dunaliella Salina as a Bioreactor)

### 发明领域(Field of the Invention)

本发明涉及一种生物反应器及其制备方法和用途，尤其涉及一种转基因盐藻生物反应器及其制备方法和用途。

### 背景技术(Background of the Invention)

众所周知，人或兽用疫苗，如乙型肝炎表面抗原(HBsAg)，流感病毒血凝素，艾滋病毒抗原(HIV-1 gp120)，疟疾抗原，口蹄疫病毒抗原等，是预防和控制传染病的重要手段。这些人或兽用疫苗可以通过微生物发酵和转基因动物等生产系统获得，但是，由于这些方法存在下述缺陷而使其应用受到很大限制：1、一些微生物系统不能对真核生物蛋白进行准确的翻译后加工和蛋白糖基化；大肠杆菌发酵过程常常产生一些不溶性聚合物，而将这些聚合物重新溶解并折叠成天然蛋白质，难度极大；此外发酵常需要庞大的设备投资。2、动物细胞培养所需费用昂贵，用转基因动物生产重组蛋白，可能会污染动物病毒，这对人类可能造成潜在威胁。

例如，目前临床上使用的疫苗主要由啤酒酵母表达的乙型肝炎表面抗原主蛋白颗粒组成，效果良好，对控制乙型肝炎传播起到了巨大作用。但这种疫苗有一些不足之处。例如，部分人群对疫苗存在不反应或低反应性，疫苗接种后可能产生逃逸突变。且疫苗价格高，难于在贫穷的发展中国家普遍推广。因此开发效果好、使用方便而且价廉的疫苗，对于全球范围内控制乙型肝炎病毒传播具有重要意义。

与微生物发酵和转基因动物等生产系统相比，植物作为生产药用蛋白的生物反应器，不仅使用安全，而且成本低廉。这是因为，首先，植物病毒不会感染人类，故用转基因植物生产重组蛋白更为安全；其次，

植物细胞培养不需要昂贵培养基和复杂的纯化系统，也不需要严格无菌的生产条件和冷藏保存。

转基因植物的研究始于 20 世纪 90 年代。例如 1992 年成功地将乙型肝炎表面抗原基因转入烟草，此后在可食性植物如马铃薯、羽扇豆、莴苣等进行了大量研究。上述研究初步证明，这些植物可以表达人乙型肝炎表面抗原蛋白，但是蛋白表达量低，而且这些植物生长受季节性限制，不可能经常生食；加之食用不方便。因此，难于在人群，尤其是儿童中广泛推广。

本发明的一个目的在干提供一种新型高效转基因盐藻生物反应器，采用该反应器，可以制备或生产多种贵重的药用蛋白及人和兽用疫苗。

本发明的另一个目的是提供一种制备转基因盐藻生物反应器的方法。

本发明的再另一个目的是将本发明的转基因盐藻生物反应器用于制备多种适用于人和动植物的药用蛋白、疫苗和激素等。

除非特别指明，本发明中使用的术语“盐藻”(*Dunaliella salina*)是指绿藻门团藻目多睫毛藻科生物。为单细胞真核生物，个体呈梨形或椭圆形，细胞体积  $50-1000 \mu m^3$ 。具有 2 条长鞭毛，可自由游动。盐藻细胞与其它一些单细胞真核藻类最大的不同点是它缺乏细胞壁，细胞外仅包被一薄层弹性浆膜。藻体内有一杯状叶绿体，内含一个造粉核。藻体前端有一红色眼点。其繁殖主要靠细胞纵裂的无性繁殖，有性生殖为同配接合。

术语“转基因”是指导入宿主个体的一段外源的双链脱氧核糖核酸(DNA)片段，可以游离在染色体外，也可以整合到染色体的基因组上；可以通过生殖过程传递到后代，也可以不传递到后代。

术语“外源目的基因”是指导入宿主个体的转基因中能编码蛋白或多肽产物的 DNA 序列。

术语“生物反应器”是指能生产外源目的基因产物的转基因动、植物个体表达系统。

术语“筛选标记基因”是指编码特定的蛋白或多肽产物的 DNA 序列，携带该序列的宿主可在特定的选择培养基中生长，并能得到扩增和筛选。

附图的简要说明(Brief Description of the Drawings)

图 1 为本发明中肿瘤坏死因子 (TNF) 叶绿体表达载体 p64-TNF-AAD 的示意图。

图 2 为重组 HBsAg 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建过程示意图

图 3 为盐藻表达载体 pCAMBIA-DS1644 的示意图

图 4 为重组 HbsAg 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的示意图

发明概述(Summary of the Invention)

为了达到上述目的，本发明人进行了深入细致的研究，结果出人意料地发现，将来自微生物、动物和植物的外源基因，通过目前国际上公认较为成熟的遗传转化技术（电激法，PEG 法，基因枪法等）导入作为宿主的盐藻细胞中，并通过筛选，可以建立一种新型高效的盐藻生物反应器，该反应器可以用来廉价生产许多人用和兽用药物或疫苗、植物激素及其他生物活性物质，从而实现了上述发明目的。

本发明提供了一种转基因盐藻生物反应器，它含有作为宿主的盐藻、外源目的基因和筛选标记基因。

根据本发明的转基因盐藻生物反应器的一种优选实施方案，其中外源目的基因为来自微生物、植物、人和动物的基因。

根据本发明的转基因盐藻生物反应器的另一种优选实施方案，其中所述筛选标记为选自 aadA 基因编码的壮观霉素/链霉素抗性，cat 基因编码的氯霉素抗性，npt II /neo 基因编码的卡那霉素/新霉素抗性，Hyg<sup>r</sup> 基因编码的潮霉素抗性中的至少一种。

本发明还提供了一种制备转基因盐藻生物反应器的方法，包括如下步骤：

- a) 利用转基因技术，将外源目的基因导入盐藻；
- b) 通过筛选标记建立转基因盐藻藻株。

本发明还提供了本发明的转基因盐藻生物反应器在制备人或兽用疫苗中的用途。

发明详述 (Detailed Description of the Invention)

本发明提供了一种转基因盐藻生物反应器，它含有外源目的基因、筛选标记基因和作为宿主的盐藻。

将盐藻作为宿主能够使本发明的生物反应器具有优异的性能，这是因为：盐藻是目前所知耐盐性最强的单细胞真核生物，生长在海水或咸水湖等高盐环境下，由于无细胞壁可通过快速的细胞体积变化来适应细胞外渗透压的变化。因此对环境适应性极强，可在低浓度（0.2%）和接近饱和的高浓度（35%）盐水中生长。盐藻具有很强的光合作用能力，能利用水和空气中的二氧化碳在阳光照射下合成蛋白质等多种有机物，因此盐藻的养殖容易，成本低廉。

根据本发明的转基因盐藻生物反应器的一种优选实施方案，其中外源目的基因为来自微生物、植物、人和动物的基因。本发明中所述的外源目的基因可以是任何生物基因组中克隆的，也可以是人工合成的或用 PCR 在体外扩增的。

其中，来自微生物和植物的外源目的基因的例子包括但不限于：各型肝炎病毒、艾滋病毒、口蹄疫病毒、杀幼蚊毒素、细胞分裂素、内切几丁质酶、葡萄糖淀粉酶 P、超甜定、种子储藏蛋白基因等。

来自人和动物的外源目的基因的例子包括但不限于：血管抑素、内皮抑素、血红蛋白、人凝血因子III、人红细胞生成素、干扰素、肥胖蛋白、人白细胞介素、人粒细胞集落刺激因子、人巨噬细胞集落刺激因子、链激酶、人蛋白激酶、生长激素、组织血纤维蛋白溶酶原激活因子、唾液酸醛缩酶、防御素、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、牛凝乳乳蛋白酶、抗菌肽基因等。

上面列举的这些外源目的基因均可单独构建盐藻基因组表达载体、叶绿体表达载体和自主复制表达载体三种表达载体中的一种或几种。

根据本发明的转基因盐藻生物反应器的另一种优选实施方案，其中所述筛选标记为选自 aadA 基因编码的壮观霉素/链霉素抗性，cat 基因编码的氯霉素抗性，npt II /neo 基因编码的卡那霉素/新霉素抗性，llyg' 基因编码的潮霉素抗性，Bar 基因编码的除草剂抗性中的至少一种。

本发明还提供了一种制备转基因盐藻生物反应器的方法，包括如下

步骤: a) 利用转基因技术, 将外源目的基因导入盐藻;

b) 通过筛选建立转基因盐藻藻株。

根据本发明的制备方法的一种优选变化形式, 步骤 a) 中所述的转基因技术可以为遗传转化方法中的生物学、物理学和化学方法中的任何一种。具体地说, 在本发明中, 可通过转基因技术中的遗传转化生物学方法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达, 以获得转基因盐藻藻株。也可用物理和化学方法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达, 以获得转基因盐藻藻株。

其中所述的生物学方法可为用农杆菌 Ti 质粒转化系统将外源性目的基因导入盐藻细胞并得到表达的方法; 也可用植物病毒载体系统将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达的方法。

其中所述的物理和化学方法可为下列方法中的任意一种或多种:

a、用 聚乙二醇 (PEG) 处理法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

b、用脂质体法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

c、用电激法将外源性目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

d、用超声波导入法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

e、用基因枪法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

f、用显微注射法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

g、用紫外激光微束法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

h、用玻璃珠搅拌法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

i、用气溶胶基因导入法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

根据本发明的一种优选实施方案, 在将外源目的基因导入盐藻细胞前还包括构建盐藻表达载体的步骤和/或培养盐藻的步骤。

根据本发明的一种特别优选的实施方案, 本发明的转基因盐藻生物反应器, 以转乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 基因盐藻为例的制备方法包括如下步骤:

a) 构建编码重组 HBsAg 蛋白基因的 CtxB SS1 融合基因;

b) 构建含有 a) 中所述融合基因的盐藻表达载体 pCAMBIA-CtxB-SS1;

c) 将所述表达载体导入盐藻;

d) 继代选择培养;

其中, 重组乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 蛋白基因包括乙型肝炎病毒 S 基因、PreS1 基因和 PreS2 基因的全部或部分序列及其组合; SS1 基因是指 S 基因和 ProS1 基因部分序列的融合; CtxB-SS1 融合基因是指霍乱毒素 B 亚单位基因 (CtxB) 和 SS1 基因的融合。

根据本发明的一种优选实施方案, 将 CtxB-SS1 融合基因序列插入到盐藻 Hsp70B 5'启动子和 T Nos 终止子之间, 构成完整的表达盒, 使 CtxB-SS1 融合基因在盐藻 Hsp70B 5'启动子控制下转录。

根据本发明的另一种优选实施方案, 所述表达载体中含有两个同向的核基质结合序列 (Matrix attachment region, MAR) MAR1 和 MAR2, 在 MAR1 和 MAR2 间插入能表达硝酸盐还原酶的 Nit1 5'—Nit1—T-Nos 表达盒, 供筛选转化藻用。

本发明还提供了本发明的转基因盐藻生物反应器在制备人或兽用疫苗中的用途。利用本发明的转基因盐藻可制备或生产人或兽用疫苗, 如乙肝表面抗原 (HBsAg), 流感病毒血凝素, 艾滋病毒抗原 (HIV-1 gp120), 疟疾抗原, 口蹄疫病毒抗原; 以及植物激素等生物活性物质。

尽管不愿受到任何理论的束缚, 但是, 可以认为本发明的转基因盐藻生物反应器具有诸多其它生物反应器无可比拟的优越性: 1、盐藻为单细胞生物, 蛋白含量较高; 繁殖快, 无季节性生长限制, 可在短时间内产生数量巨大的后代个体, 便于转基因藻的筛选。2、盐藻属于低等真核绿藻, 无细胞壁, 基因组相对较小, 遗传操作比较容易。细胞内有一个大的叶绿体, 有利于外源基因的叶绿体转化, 而且为母系遗传, 不会对环境造成危害, 也不易发生基因沉默。3、盐藻属自养生物, 不需要昂贵的培养基, 只需适宜的光照, 温度 and 无机盐, 故培养成本低廉; 盐藻可在高渗盐培养液中生长, 这是许多其它生物难以生存的环境, 故其大规模培养不需昂贵的发酵罐或其他培养装置, 可以直接采用开放式培养, 因此也大大降低生产成本。4、盐藻为真核生物, 其表达产物可自行完成翻译后加工, 如二硫键形成、蛋白质糖基化等, 因此简化了基因工程技术下游工艺并能保证产品的生物活性和质量。5、盐藻本身无毒, 富含多种天然维生素和多种不饱和脂肪酸, 食用价值高。用盐藻生产口服型疫苗

或其它口服型药物，甚至无须纯化即可直接服用，大大降低生产成本。6、该反应器系统可用于生产人用和兽用药物或疫苗、植物激素及其他生物活性物质。

下面结合实施例对本发明进行进一步描述，这些实施例仅用于解释本  
5 发明，而不是对本发明的限制。

## 实施例(Examples)

### 实施例 1

#### 一、盐藻培养技术

10 1、液体培养：藻种接种于 Mclachlan 培养液，培养条件如下：温度 20-30℃，光照强度 3000 勒克司，每天光照培养 14 小时，黑暗培养 10 小时。

15 2、固体培养：Mclachlan 培养液中加入琼脂浓度为 0.5-0.8%，于超净台用消毒白金耳从液体培养液取藻种立即接种到固体培养基面上，置恒温箱内培养，恒温箱中需配置荧光灯照射，按液体培养条件要求进行培养。

#### 二、肿瘤坏死因子 (TNF) 叶绿体表达载体 p64C-TNF-AAD 的构建

20 (1) 载体 pSK-atpX 上克隆有叶绿体 atpA 的 5' 启动子序列和 rbcL 的 3' 终止子序列，可以在叶绿体中高效表达插入的外源基因。质粒 pUC19-TNF 上含有人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的 cDNA 基因片断，长度约为 600bp，两端分别为 BamH I 和 Xba I 酶切位点，将载体 pSK-atpX 和质粒 pUC19-TNF 均用 BamH I 和 Xba I 双酶切割后，将 TNF- $\alpha$  的 cDNA 基因片断插入到 pSK-atpX 上 atpA 的 5' 启动子序列和 rbcL 的 3' 终止子序列之间，构成含有人 TNF- $\alpha$  基因表达盒 (atpA5'-TNF-rbcL3') 的中间载体 pSK-atpX-TNF。

25 (2) 载体 p64C 上克隆有叶绿体同源片段 clpP-trnL-petB 基因及 chlL 基因的 5' 和 3' 非编码区。将载体 p64C 和第 (1) 项得到的中间载体 pSK-atpX-TNF 均用 EcoR V 和 Sac I 双酶切割后，将切下的 TNF- $\alpha$  基因表达盒插入到 p64C 中，构成叶绿体中间表达载体 p64C-atpX-TNF。其中 TNF- $\alpha$  基因表达盒位于 chlL 和 atpA 的双重启动子下游，使 TNF- $\alpha$  基因增强  
30 表达。

(3) 载体 pUC-atpX-AAD 上克隆有 *aadA* 基因表达盒(atpA5'-*aadA*-*rbcl*3'), 可以表达氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶(壮观霉素抗性选择标记)。将载体 pUC-atpX-AAD 以 *EcoR* V 和 *Sac* I 双酶切割, 切下 1.9kb 的 *aadA* 基因表达盒, 同时将第(2)项得到的叶绿体中间表达载体 p64C-atpX-TNF 用 *Not* I 切割后经 T<sub>4</sub>DNA 聚合酶补成平端, 再用 *Sac* I 切割, 最后将 *aadA* 基因表达盒插入到 p64C-atpX-TNF 中, 构成叶绿体表达载体 p64C-TNF-AAD (如图所示), 其中含有人 TNF- $\alpha$  基因表达盒(atpA5'-TNF-*rbcl*3') 和 *aadA* 基因表达盒(atpA5'-*aadA*-*rbcl*3'), 且 TNF- $\alpha$  基因表达盒直接位于 *chlL*5' 下游, 使 TNF- $\alpha$  基因在 *chlL* 和 *atpA* 的双重启动子作用下得到增强表达, 同时 *aadA* 基因表达盒可表达壮观霉素抗性, 便于重组子的筛选。

### 三、将外源目的基因导入盐藻

#### 1、用电激法将外源目的基因导入盐藻

取培养第 5 天的盐藻培养液, 1000rpm 离心 15min, 弃上清, 用含有 0.2M 甘露醇和 0.2M 山梨醇液处理后加入电激缓冲液, 调整盐藻密度在  $10^8$  个/ $\text{mm}^3$ 。继之加入终浓度为  $10\mu\text{g/ml}$  的含外源基因的质粒及  $25\mu\text{g/ml}$  的鲑精 DNA, 混匀后, 置冰上 5-10min, 吸取 0.5ml 置于轰击小室中待用。电激仪 (Backon 2000 型) 电激时电压为 9.5KV, 每次电激时间为 0.05 $\mu\text{s}$ , 次数为  $2^{10}$ , 循环次数 100 次, 电激高度 2mm, 每次电激间隔时间为 62.5sec。

#### 2、用基因枪法将外源目的基因导入盐藻

取培养第 5 天的盐藻培养液, 1000rpm 离心 15min, 弃上清, 用盐藻培养液将盐藻密度调整在  $10^8$  个/ $\text{mm}^3$ , 再取 0.5ml 盐藻培养液铺于含抗生素的固体培养基中央, 直径为 3cm 的圆形有效轰击范围内, 置超净台下吹干待用。

在无菌条件下, 用基因枪 (Bio-Rad 公司产的 PDS-1000 型) 轰击。具体步骤如下: 取  $50\mu\text{l}$  ( $60\mu\text{g/ml}$ ) 金粉悬浮液加入  $6\mu\text{g}$  含有外源基因的质粒以及  $50\mu\text{l}$  2.5M  $\text{CaCl}_2$  和  $20\mu\text{l}$  0.1M 亚精胺, 振荡 3min, 12000rpm 离心 10 sec, 弃上清。用无水乙醇洗一次, 振荡, 12000rpm 离心, 弃上清, 共二次。最后将附有金粉的质粒悬浮于  $60\mu\text{l}$  无水乙醇中。每次轰击取 6-8 $\mu\text{l}$ , 每皿轰击 3 次, 轰击后将培养皿放入盐藻适宜培养条件下



培养。

### 3、用 PEG 法将外源目的基因导入盐藻

取 0.5ml 盐藻培养液（细胞密度  $10^7$ - $10^8$  个 /ml），在超净台内接种于含抗生素的固体培养基上，直径为 3cm，吹干待用。

5构建携带外源目的基因的农杆菌 Ti 质粒和盐藻细胞原生质体。尔后将新制备的原生质体悬浮液与 Ti 质粒 DNA 一起保温培养，同时加入分子量 4000-6000 的 PEG，在 pH8-9 下促进原生质体摄取 DNA，从而使细胞转化，为促进转化，在转化培养时加入运载 DNA（小牛胸腺 DNA），培养后离心收集原生质体，并重新悬浮到原生质体培养基中继续培养。

### 10四、转基因盐藻转化子的筛选

取电激法、基因枪法或 PEG 介导基因转化法的盐藻细胞团，铺于含有适当选择标记的固体培养基上进行筛选培养。在适宜培养条件，2-4 周后出现若干藻落，再将此藻落悬浮培养于不含抗生素的液体培养液中，3-5 天后再在抗生素的固体培养基上进行二次筛选，以后经 10 次以上继代培养，即可大量繁殖。

## 实施例 2

### 一、盐藻培养技术

同实施例 1

### 20二、HBsAg 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建

#### 1. 重组乙肝表面抗原 SS1 融合基因的构建

质粒 pBS-SK-HBS 上克隆有乙肝病毒 S 基因、Pre-S2 基因和 Pre-S1 基因序列，设计四条引物：

引物 1：5'-GCAGTCGACCCAATG GAGAGCAC-3'；

Sal I

引物 2：5'-GCGGGTACCAGG AATGTATACCC-3'；

Kpn I

引物 3：5'-CTGGGTACCCCA AATCCTCTGGG-3'；

Kpn I

30引物 4：5'-GCGGCATGCTTA GTTGGGGTTG-3'；

## Sph I

分别以引物 1 和 2 扩增 SHBsAg(1-226aa), 以引物 3 和 4 扩增 PreS1 Ag (20-48aa) DNA 片段, 经酶切、回收后连接到质粒 pUC18 的 Sal I/Sph I 位点, 构建成编码重组乙肝表面抗原 SS1 [包括 SHBsAg(1-226aa) 和 PreS1 Ag (20-48aa)] 的融合基因片段, 质粒命名为 pUC18-SS1。

## 2. CtxB-SS1 融合基因的构建

(1) 根据文献报道的霍乱毒素 B 亚单位基因 (CtxB) 序列, 设计两条引物:

正向引物: 5'-GCGGGATCCATG ATTAATTAATAATTGG-3'

BamH I

反向引物: 5'-GCGGTCGACAGG ATTTGCCATACTAATTGC-3'

Sal I

以古典霍乱小川型疫苗菌 CVC 0139 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 CtxB 基因序列约 380bp, 经 BamH I/Sal I 酶切后克隆到质粒 pUC18 上, 构建成质粒 pUC18-CtxB。

(2) 以 Sal I/Sph I 双酶切割质粒 pUC18-SS1, 切下 SS1 融合基因片段约 770bp, 连接入质粒 pUC18 CtxB 的 Sal I/Sph I 位点, 构成含 CtxB 基因和 SS1 基因片断的融合基因质粒 pUC18-CtxB-SS1。

## 3. Hsp70B 5'-CtxB-SS1-T-Nos 表达盒的构建

质粒 pSP72-Hsp-Nos 中克隆有盐藻 (D. Salina UTEX1644) 热休克蛋白 Hsp70B 5'启动子和 T-Nos 终止子。用 BamH I/Sph I 双酶切割质粒 pSP72-Hsp-Nos 和 pUC18-CtxB-SS1, 将 CtxB-SS1 融合基因序列连接到 Hsp70B 5'启动子和 T-Nos 终止子之间, 构成完整的表达盒, 使 CtxB-SS1 融合基因在 Hsp70B 5'启动子控制下转录。

## 4. 盐藻表达质粒 pCAMBIA-CtxB-SS1 的构建

盐藻表达载体 pCAMBIA-DS1644 中含有两个同向的核基质结合系列 (MAR1 和 MAR2, 在 MAR1 与 MAR2 序列间顺序连接有 Nit5' Nit1-T-Nos 表达盒 (可表达盐藻硝酸盐还原酶, 用于转化藻的筛选)、多克隆位点 MCS (来源于 pUC18) 和 Nit5'-BAR-T-Nos 表达盒 (可表达 PPT 抗性, 用于转化藻的辅助筛选), 将构建完整的 Hsp70B 5'-CtxB-SS1-T-Nos 表达盒

用 EcoR I/Xho I 切下后, 连入载体 pCAMBIA-DS1644 的 EcoR I/Sal I 位点, 构建成表达质粒 pCAMBIA-CTP-SS1, 该质粒可由 MAR1 和 MAR2 序列介导同源重组, 使 Nit1 表达盒和 CtxB SS1 表达盒及 BAR 表达盒整合于盐藻染色体活跃转录区, 经 PPT 抗性筛选和硝酸盐选择培养筛选鉴定转化藻。转化藻可经由温度诱导高效表达 CtxB 和 SS1 的融合蛋白。

### 三、将外源目的基因导入盐藻

#### 1、用电激法将外源目的基因导入盐藻

同实施例 1

#### 2、用基因枪法将外源目的基因导入盐藻

同实施例 1

#### 3、用 PEG 法将外源目的基因导入盐藻

同实施例 1。

### 四、转基因盐藻转化了的筛选

取电激法、基因枪法或 PEG 法转化的盐藻细胞团, 用 1ml 培养液 A (5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、5mM  $\text{NaNO}_2$ ) 洗下, 300 lux 弱光培养 2-3 天, 转入含  $3 \mu\text{g/ml}$  PPT 的培养液 A 中继续培养 5-7 天, 光照周期为 12 小时/天, 光强为 1600 lux; 之后转入培养液 B (10mM  $\text{NaNO}_3$ ) 中继续光照培养 7-10 天。继之涂布于培养液 B 平板上 (1.0%琼脂) 光照培养 10-15 天至转化藻落出现。

## 权利要求书

### (What is claimed)

1、一种转基因盐藻生物反应器，它含有外源目的基因、筛选标记基  
5 因和作为宿主的盐藻。

2、根据权利要求 1 的生物反应器，其中所述的外源目的基因为来自  
微生物、植物、人和动物的基因。

3、根据权利要求 2 的生物反应器，其中所述的来自微生物和植物的  
外源目的基因，包括但不限于：各型肝炎病毒、艾滋病毒、口蹄疫病毒、  
10 杀幼蚊毒素、细胞分裂素、内切儿丁质酶、葡萄糖淀粉酶 P、超甜定、种  
了储藏蛋白基因等。

4、根据权利要求 2 的生物反应器，其中所述的来自人和动物的外源  
目的基因，包括但不限于：血管抑素、内皮抑素、血红蛋白、人凝血因  
子III、人红细胞生成素、干扰素、肥胖蛋白、人白细胞介素、人粒细胞  
15 集落刺激因子、人巨噬细胞集落刺激因子、链激酶、人蛋白激酶、生长  
激素、组织血纤维蛋白溶酶原激活因子、唾液酸醛缩酶、防御素、肿瘤  
坏死因子、表皮生长因子、牛凝乳乳蛋白酶、抗菌肽基因等。

5、根据权利要求 1 的生物反应器，其中所述的筛选标记基因，包括  
但不限于：aadA 基因编码的壮观霉素/链霉素抗性，cat 基因编码的氯霉  
20 素抗性，npt II/neo 基因编码的卡那霉素/新霉素抗性，Hyg<sup>r</sup> 基因编码的  
潮霉素抗性等。

6、一种制备转基因盐藻生物反应器的方法，包括如下步骤：

a) 利用转基因技术，将外源目的基因导入盐藻；

b) 通过筛选建立转基因盐藻藻株。

7、根据权利要求 6 的方法，其中步骤 a) 中所述的转基因技术为遗传  
25 转化方法中的生物学、物理学和化学方法中的任何一种。

8、根据权利要求 7 的方法，其中所述的生物学方法为用农杆菌 Ti  
质粒转化系统或者植物病毒载体系统将外源性目的基因导入盐藻细胞并  
得到表达的方法。

9、根据权利要求 7 的方法，其中所述的物理学和化学方法可为下列  
30

方法中的任何一种或多种：聚乙二醇(PEG)法、脂质体法、电激法、超声波导入法、基因枪法、显微注射法、紫外激光微束法、玻璃珠搅拌法、气溶胶基因导入法。

5 10、根据权利要求 7-9 中任一项的方法，其中在将外源目的基因导入盐藻细胞前还包括构建盐藻表达载体的步骤和/或培养盐藻的步骤。

11、根据权利要求 1-6 中任一项的转基因盐藻生物反应器在制备人用或兽用药物或疫苗、植物激素中的用途。

说明书摘要  
(Abstract)

5 一种转基因盐藻生物反应器，它含有外源目的基因和特定的筛选标记基因以及作为宿主的盐藻。它是利用转基因技术方法，将外源目的基因导入盐藻，并通过筛选建立转基因盐藻藻株而制得的，该反应器可以用于制备目的基因产物。本发明的生物反应器易于遗传操作，有利于外源基因的转化，不会对环境造成危害，并且易于培养，成本低廉，易于工业化生产。此外，由于盐藻细胞无毒性，供口服的产品纯化过程简便。

10